

(12) NACH DEM VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. März 2001 (15.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/18190 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/00**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/08581**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
2. September 2000 (02.09.2000)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
199 42 742.9 7. September 1999 (07.09.1999) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).**
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **EHRHARDT, Thomas [DE/DE]; Maulbronner Hof 49, 67346 Speyer (DE). LERX CHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE). STITT NIGEL, Marc [GB/DE]; Brückenstrasse 16, 68535 Edingen-Neckarhausen (DE). ZRENNER, Rita [DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE). SCHROEDER, Michael [DE/DE]; Talstrasse 23, 68259 Mannheim (DE).**
- (74) Gemeinsamer Vertreter: **BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).**
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/18190 A2

(54) Title: DIHYDROOROTASE EXTRACTED FROM PLANTS

(54) Bezeichnung: DIHYDROOROTASE AUS PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a DNA which codes for a polypeptide having dihydroorotase (EC 3.5.2.3) activity. The invention also relates to the use of these nucleic acids for producing a test system.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine DNA codierend für ein Polypeptid mit Dihydroorotase (EC 3.5.2.3) Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Nukleinsäure zur Herstellung eines Testsystems.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Dihydroorotase aus Pflanzen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung pflanzlicher Dihydroorotase als neues Ziel für herbizide Wirkstoffe. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin DNA-Sequenzen kodierend für ein Polypeptid mit Dihydroorotase (EC 3.5.2.3)-Aktivität.

10 Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure kodierend für ein Protein mit Dihydroorotase-Aktivität pflanzlichen Ursprungs zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung, sowie Inhibitoren pflanzlicher Dihydroorotase identifiziert unter
15 Verwendung dieser Verfahren bzw. dieses Testsystems. Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus eine DNA Sequenz kodierend für ein Polypeptid mit Dihydroorotatdehydrogenase-Aktivität und seine Verwendung als Hilfsenzym in einem molekularen Testsystem. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäure
20 kodierend für pflanzliche Dihydroorotase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der Dihydroorotase. Darüber hinaus betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs dadurch gekennzeichnet, daß die zu beseitigenden Pflanzen mit einer Verbindung
25 behandelt werden, die spezifisch an Dihydroorotase, codiert durch eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser DNA-Sequenz hybridisierenden DNA-Sequenz, bindet und deren Funktion inhibiert.

30

Pflanzen sind in der Lage, aus Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Salzen ihre Zellkomponenten zu synthetisieren.

Dieser Prozeß ist nur möglich, indem biochemische Reaktionen zum
35 Aufbau organischer Substanzen genutzt werden. Pflanzen müssen die Nukleotide als Bestandteile der Nukleinsäuren de novo synthetisieren.

Sowohl die Enzymreaktionen der de novo Purinbiosynthese als auch
40 die Enzymreaktionen der de novo Pyrimidinbiosynthese sind zur Regulation des Nukleotidstoffwechsels wichtig. Eines dieser Enzyme ist die Dihydroorotase. Das Enzym katalysiert die Wasserabspaltung von Carbamoylaspartat und Cyclisierung zu Dihydroorotate. Das darauffolgende Enzym Dihydroorotatdehydrogenase setzt
45 Dihydorotate zu Orotat über eine Redoxreaktion um, siehe Abbildung 1.

Gene, die für Dihydroorotases kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen isoliert. Aus Bakterien sind vollständige cDNA Sequenzen bekannt (GenBank Acc Nr. M97254, *Pseudomonas putida*, X84262 *Lactobacillus leichmannii*, AE000207 *Escherichia coli*, M97253
5 *Pseudomonas putida*, P74438 *Synechocystis*). In Eukaryonten ist die Dihydroorotase Bestandteil eines multifunktionellen Enzymkomplexes, welcher auf einer kodierenden Sequenz lokalisiert ist (z.B. X03881 *Drosophila melanogaster*). Auch in Hefe liegt die Dihydroorotase in einem Multienzymkomplex vor (Souciet et al., Mol. Gen.
10 Genet. 207 (2-3), 314-319 (1987)). In Pflanzen ist die Dihydroorotase nicht Bestandteil eines polyfunktionellen Polypeptids sondern liegt ähnlich wie in *E. coli* als ein separates Enzym vor. Eine pflanzliche Dihydroorotase wurde bisher nur aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (Genbank Acc. Nr. AF000146; Zhou et al., Plant
15 Physiol. 114 (1997), 1569).

Der Nachweis der Eignung eines Enzyms als Herbizid-Target kann zum Beispiel durch Verringerung der Enzymaktivität mittels der Antisensetechnik in transgenen Pflanzen gezeigt werden. Wird auf 20 diese Weise ein verringertes Wachstum bewirkt, so lässt sich damit auf eine Eignung des in seiner Aktivität reduzierten Enzyms als Wirkort für herbizide Wirkstoffe schließen. Beispielhaft wurde dies für die Acetolactat Synthase mit transgenen Kartoffelpflanzen gezeigt (Höfgen et al., Plant Physiology 107 (1995),
25 469-477).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es zu belegen, daß Dihydroorotase in Pflanzen ein geeignetes herbizides Target ist, die Isolierung einer vollständigen pflanzlichen cDNA kodierend für
30 das Enzym Dihydroorotase und deren funktionelle Expression in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen, sowie die Herstellung eines effizienten und einfachen Testsystems für die Durchführung von Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien.

35 Die Aufgabe wurde gelöst durch Isolierung eines für das pflanzliche Enzym Dihydroorotase kodierenden Gens, der Herstellung von Antisensekonstrukten der Dihydroorotase, sowie der funktionellen Expression der Dihydroorotase in bakteriellen oder eukaryotischen Zellen.

40 Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine DNA-Sequenz SEQ-ID NO:1 enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen Dihydroorotase aus *Solanum tuberosum* (Kartoffel), siehe Beispiel 1 und 2.
45

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind DNA-Sequenzen, die von dieser SEQ-ID NO:1 abgeleitet sind oder mit dieser hybridisieren und die für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer Dihydroorotase besitzt.

5

Pflanzen der Linien ROSa, die ein Antisensekonstrukt der Dihydroorotase tragen wurden näher charakterisiert. Die Pflanzen zeigen in unterschiedlichem Maße eine Wachstumsretardierung. Die Pflanzenlinie ROSa-40 ist so stark betroffen, daß keine Knollen gebildet werden. Pflanzen dieser Linie sind im Gewächshaus nicht lebensfähig und müssen in vitro erhalten werden. Es läßt sich eine Korellation zwischen Wachstumsretardierung und Reduktion der Dihydroorotase Proteinmenge feststellen. Dieser klare Zusammenhang weist Dihydroorotase eindeutig als neues Zielprotein für 10 herbizide Wirkstoffe aus, siehe Beispiel 3 - 7.

Um effiziente Hemmstoffe der pflanzlichen Dihydroorotase finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur 20 Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz der Dihydroorotase aus Solanum tuberosum in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in E. coli überexprimiert, siehe Beispiel 8.

25 Alternativ kann jedoch die Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 beispielsweise in anderen Bakterien, in Hefen, Pilzen, Algen, Pflanzenzellen, Insektenzellen oder Sägetierzellen exprimiert werden.

30 Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette exprimierte Dihydroorotase-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die Dihydroorotase spezifischen Hemmstoffen.

Dazu kann die Dihydroorotase beispielsweise in einem Enzymtest 35 eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der Dihydroorotase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen.

40

Der bisher entwickelte enzymatische Nachweis zur Messung der Dihydroorotaseaktivität nach Mazus und Buchowicz, (Acta Biochimica Polonica (1968), 15 (4), 317-325) beruht auf dem Nachweis des gebildeten Orotats in einem mit Dihydroorotatdehydrogenase gekoppelten Reaktionsansatz bei 280 nm. Dieser Assay ist nicht für eine Massentestung geeignet. Daher wurde das Verfahren so gestaltet, daß gebildetes NADH bei 340 nm erfaßt werden kann. Dies

setzt eine hohe Aktivität des Hilfsenzyms, der Dihydroorotatdehydrogenase voraus. Eine käuflich erhältliche Präparation aus *Zymobacterium oroticum* (Sigma) erwies sich als zu unrein um die NADH-Bildung verfolgen zu können. Um eine Massentestung durchführen zu können, muß die spezifische Dihydroorotatdehydrogenase-Aktivität mindestens zehnfach höher sein, als in der käuflichen Präparation vorliegend. Eine solche Aktivität konnte erhalten werden nach Isolation einer pflanzlichen Dihydroorotatdehydrogenase und Expression in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Daher wurde ein Testsystem auf Basis der Kopplung pflanzlicher Dihydroorotase und pflanzlicher Dihydroorotatdehydrogenase entwickelt. Dazu wurde beispielsweise das Gen kodierend für eine Dihydroorotatdehydrogenase aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (siehe Genbank Acc. Nr. x62909, Minet et al., Plant J. (1992), 2 (3), 417-422; Beispiel 15 9 - 11.

- Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.
- Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung, die die Dihydroorotase Aktivität in Pflanzen hemmen, bestehend aus
- a) der Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzengeweben, oder Pflanzenzellen, die eine zusätzliche DNA-Sequenz codierend für ein Enzym mit Dihydroorotase Aktivität enthalten und in der Lage sind eine enzymatisch aktive Dihydroorotase überzuexprimieren;
 - b) das Aufbringen einer Substanz auf transgene Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile sowie auf nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile;
 - c) das Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz; und

- d) dem Vergleich des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz;
- 5 wobei die Unterdrückung des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile ohne jedoch das Wachstum oder die Überlebensfähigkeit der transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile stark zu unterdrücken, belegt, daß die Substanz aus b) herbizide Aktivität zeigt und die Dihydroorotase Enzymaktivität in Pflanzen inhibiert.
- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Be- seitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs dadurch gekennzeichnet, daß die zu beseitigenden Pflanzen mit einer Verbindung behandelt werden, die spezifisch an Dihydroorotase, codiert durch eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser DNA-Sequenz hybridisierenden DNA-Sequenz, bindet und deren Funktion inhibiert.
- 15 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit herbizider Wirkung, die mit dem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.
- 25 Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung können als Defoliants, Desiccants, Krautabtötungsmittel und insbesondere als Unkrautvernichtungsmittel verwendet werden. Unter Unkraut im weitesten Sinne sind alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind. Ob die mit Hilfe des 30 erfindungsgemäßen Testsystems gefundenen Wirkstoffe als totale oder selektive Herbizide wirken, hängt unter anderem von der angewandten Menge ab.
- Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung können 35 beispielsweise gegen folgende Unkräuter verwendet werden:
- Dikotyle Unkräuter der Gattungen:
Sinapis, Lepidium, Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis, Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Amaranthus, Portulaca, Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotala, Lindernia, Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus, Taraxacum.
- 40 45 Monokotyle Unkräuter der Gattungen:
Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca, Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum,

Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus, Apera.

- 5 Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren Sequenz für eine Dihydroorotase aus Solanum tuberosum oder deren funktionelles Äquivalent kodieren. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein.
- 10 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, 15 einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das Dihydroorotase-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung 20 von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.
- 25 Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Dihydroorotase-DNA Sequenz und einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und 30 J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in 35 Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.
- Die Sequenzhomologie zwischen Dihydroorotase aus Solanum tuberosum und aus Arabidopsis thaliana beträgt auf Protein-Ebene 40 78% Identität. Die Homologie wurde mit dem Programm BLASTP erhalten (Altschul et al., Nucleic Acids Res. (1997) 25, 3389-3402), siehe Beispiel 2.

Gegenstand der Erfindung sind auch funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein Dihydroorotase-Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge des Gens eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 von 40 bis 100 % aufweisen.

5

Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein Dihydroorotase-Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge des Gens eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 von 60 bis 100 % aufweisen.

10

Besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein Dihydroorotase-Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge des Gens eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 von 80 bis 15 100 % aufweisen.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein Dihydroorotase-Gen kodieren, sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vor kommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

25

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine Dihydroorotase kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen 30 Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorlie gende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation dieser Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann 35 z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel der Herstellung von ausreichenden Mengen des Enzyms Dihydroorotase eingesetzt werden.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein aus Solanum tuberosum gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz SEQ-ID NO:2 bzw. Derivate oder Teile dieses Proteins mit Dihydroorotase Aktivität. Im Vergleich zu der Dihydroorotase aus *Arabidopsis thaliana* beträgt die Homologie auf Aminosäureebene 78 % Identität.

Gegenstand der Erfindung sind auch pflanzliche Proteine mit Dihydroorotase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu 10 der Solanum tuberosum Dihydroorotase von 20 - 100 % Identität.

Bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit Dihydroorotase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Solanum tuberosum Dihydroorotase von 50 - 100 % Identität.

15

Besonders bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit Dihydroorotase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Solanum tuberosum Dihydroorotase von 80 - 100 % Identität.

20 Weitere Aufgabe der Erfindung war die Überexpression des Dihydroorotase Gens in Pflanzen zur Herstellung von Pflanzen, die tolerant gegenüber Inhibitoren der Dihydroorotase sind.

Durch Überexpression der für eine Dihydroorotase kodierenden Gen- 25 sequenz SEQ-ID NO: 1 in einer Pflanze wird eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der Dihydroorotase erreicht. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

30 Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten Dihydroorotase-Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung oder durch einen Keimungstest ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des Dihydroorotase-Gens und deren Auswirkung auf die Resistenz gegen- 35 über Hemmstoffen der Dihydroorotase an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, enthal- 40 tend die DNA SEQ-ID No. 1, die durch zusätzliche Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 tolerant gegenüber Inhibitoren der Dihydroorotase geworden sind, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, 45 Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume,

Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, sowie Leguminosen.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Pflanzen, die nach Expression der DNA-Sequenz-SEQ ID NO:1 in der Pflanze einen erhöhten UMP-Gehalt aufweisen.

Erhöhung des Uridin-5'-phosphat (UMP)-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten UMP- Biosyntheseleistung durch funktionelle Überexpression des Dihydroorotase-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR eingebaut werden (siehe Beispiel 3).

Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21(1980), 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen Dihydroorotase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant.Mol. Biol. (1993) 22, 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/1919443), ein durch Benzenesufonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., Plant J. (1992) 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP0335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-

induzierbarer (WO 93/21334) Promotor sind in der Literatur beschrieben und können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Purinen bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus 10 Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J., (1989) 8, 2445-251).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors kann ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert 15 werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology (1995) 10, 1090-1094). Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor, den USP- oder LEB4-Promotor), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

20 Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine Dihydroorotate kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-25 Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente 30 manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

35 Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beispielsweise beschrieben, die gewünschte Eigenschaft der Erhöhung des UMP-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des Dihydroorotase-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die Dihydroorotase-Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der 40 für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen

Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-
5 Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches Dihydroorotase -Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine
10 antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf Dihydroorotase -Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das Dihydroorotase-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

15 Zweckmäßigerweise sollten die erfindungsgemäßen Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der
20 Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch
25 fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig
30 austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen,
35 Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden
40 der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids

pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Di-
5 hydroorotase kodierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in
10 "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen
15 Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, der biolistische Ansatz mit der Genkanone, die Elektroporation,
20 die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und
25 R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res.
30 12 (1984) 8711).

Mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide,
35 Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies sowie Leguminosen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakteriensuspension gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Der Biosyntheseort von Pyrimidinen ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des Dihydroorotase-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Pyrimidin-
45 Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, son-

dern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen Dihydroorotase-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Dihydroorotase Gehaltes in der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promoters die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiele

Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen zugrunde liegen:

Allgemeine Klonierungsverfahren

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *Escherichia coli* Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

Beispiel 1

10 Isolation einer cDNA codierend für eine funktionelle pflanzliche Dihydroorotase

Ein Klon kodierend für Dihydroorotase wurde aus Kartoffel über funktionelle Komplementation einer E.coli Mutante erhalten. Es 15 wurde die Mutante CGSC5152 (CS101-2U5) des E. coli Genetic Stock Centers verwendet, die eine Mutation im pyrC Genlokus kodierend für eine Dihydroorotase trägt. Die Komplementation erfolgte durch Elektrotransformation kompetenter Zellen des Stammes CGSC5152 mit einer cDNA Bank in dem Vektorplasmid pBS SK-. Die zugrunde 20 liegende Lambda ZAPII Bank (Stratagene) wurde nach Standardvorschriften ungerichtet mit EcoRI/NotI Linkern kloniert. Die RNA-Matrize für die cDNA wurde aus sink leaves (kleiner 1 cm Blättchen von 10 Wochen alten im Gewächshaus gezogenen Kartoffelpflanzen) isoliert.

25

Die transformierten E. coli Zellen wurden auf Minimalmedium M9 plattierte (Sambrook et al., 1989), das zusätzlich Methionin (20 mg/1), Ampicillin (100 mg/1) und IPTG (2.5 mM) enthielt. Es wurden insgesamt 4 Microgramm der Bank in 8 Ansätzen transformiert 30 und es konnten 36 Klone erhalten werden, die sich nach Untersuchung durch Restriktionsspaltung als gleich erwiesen.

Beispiel 2

35 Sequenzanalyse der cDNA Klone codierend für ein Protein mit Dihydroorotase Aktivität.

Die resultierenden 36 cDNA Klone kodieren für ein Polypeptid mit Homologie zu Dihydroorotasen aus anderen Organismen. Die Homologie wurde mit dem Programm BLASTP erhalten. (Altschul et al., Nucleic Acids Res. (1997) 25, 3389-3402). Demnach ist das Protein zu 78 % identisch zur Dihydroorotase aus *Arabidopsis thaliana*, 58 % zu *Synechocystis*, 55% zu E. coli und *Pseudomonas putida*. Der längste Klon wurde pyrCSt5 genannt. Das Plasmid beträgt die 45 Bezeichnung pBSSK-pyrCSt5. Die cDNA (siehe SEQ-ID No. 1) hat einen offenen Leseraster von 1046 Basenpaaren mit einem Stop-Codon in Position 1047-1049. Die Aminosäuresequenz beginnt mit

der dritten Base im Leseraster und kann in ein 348 Aminosäuren langes Polypeptid übersetzt werden (siehe SEQ-ID No. 2). Dies entspricht der Länge prokaryotischer Dihydroorotase-codierender Sequenzen.

5

Aufgrund des Leserasters der vorliegenden cDNA Sequenz lässt sich nicht mit Sicherheit ableiten, ob es sich möglicherweise um eine plastidär lokalisierte Form oder eine zytosolische Form handeln könnte.

10

Beispiel 3

Erzeugung pflanzlicher Expressionskassetten

- 15 In das Plasmid pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1980), 8711) wurde ein 35S CaMV Promotor als EcoRI-KpnI-Fragment (entsprechend den Nukleotiden 6909-7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285) inseriert. Das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835), Nukleotide 11749-11939 wurde als PvuII-HindIII-Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Linker an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle des Vektors kloniert. Es entstand das Plasmid pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221-230).
25 Die Klonierung eines Konstruktes von pyrCSt5 in antisense-Orientierung in pBinAR erfolgte über eine Asp718 Schnittstelle (interne Schnittstelle bei 964 bp) und eine BamHI Schnittstelle (aus dem Polylinker).

30 Beispiel 4

Herstellung transgener Kartoffelpflanzen

- Die Transformation von Kartoffelpflanzen (cv. Solara) mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens erfolgte mit dem entsprechenden Konstrukt pBinAR-anti-pyrCSt5. Das Plasmid wurde in Agrobacterium tumefaciens C58C1:PGV2260 transformiert (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 13 (1984), 4777-4788). Zur Transformation von Kartoffel nach Rocha-Sosa et al. (EMBO J., 8 (1988), 23-29) wurde 40 eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtkultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Physiol. Plant., 15 (1962), 473) benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm²) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es 45 folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 20°C auf MS-Medium. Die Kultivierung wurde anschließend mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt. Im wöchentlichen Rhythmus wurde

auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin und Pflanzenhormonen (Rocha-Sosa et al., EMBO J., 8, 23-29, 1989) und 1,6 g/l Glukose zur Sprossinduktion umgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 5 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar überführt.

Regenerierte Sprosse werden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer im 16 Stunden 10 hell/8 Stunden dunkel-Rhythmus bei 50% Luftfeuchte auf Fremdge-expression bzw. veränderte Metabolitgehalte und phänotypische Wachstumsmerkmale untersucht. Veränderte Nukleotidgehalte können z.B. nach der Methode von Stitt et al. (FEBS Letters, 145 (1982), 217-222) bestimmt werden.

15

Beispiel 5

Analyse von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben

20 Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann et al., Anal. Biochem. 163 (1987), 21 isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 20 Microgramm RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Duralon UV Membranen (Stratagene) überführt.

25

Zum Nachweis spezifischer Transkripte wurden nach Herstellerangaben Digoxigenin-markierte Sonden mittels PCR hergestellt und zur Hybridisierung verwendet (DIG EasyHyb, Boehringer). Anschließend wurden die Membranen 3 x 20 Min in Waschpuffer (2x 30 SSC, 0,1% SDS) bei 60 °C gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels des DIG-Detektionssystems von Boehringer mit CDP-Star als Substrat durch Lumineszenz und Exposition auf Hyperfilm ECL (Amersham).

35 Erhaltene individuelle transgene Pflanzen der Linien ROSA-34, -31, -10, -19, -9 und -3 sind als Testpflanzen auf RNA Ebene in Abbildung 3 dargestellt. Erkennbar ist eine Bande bei 1,6 kB entsprechend der erwarteten Transkriptgröße der Dihydroorotase und bei den Pflanzen ROSA-3, -9, -31, -34 das 1,1 kB Antisense-Trans-40 kript. Insbesondere für Pflanze ROSA-9 ist eine deutliche Reduktion der RNA-Menge erkennbar.

Beispiel 6

45 Nachweis des Proteins der Kartoffel Dihydroorotase in Knollen- und Blattgeweben.

Zur Erzeugung eines polyklonalen Serums gegen das Dihydroorotase-Polypeptid wurde eine Peptidsequenz aus der Aminosäuresequenz der Dihydroorotase aus Kartoffel gewählt. Das Peptid LGTDSAPHDRRKEC wurde von einem kommerziellen Anbieter synthetisiert (Eurogentec, 5 Seraing, Belgium) und über das C-terminale Cystein an KLH (key-hole limpet protein) gekoppelt. Das Konjugat wurde ebenfalls vom kommerziellen Anbieter (Eurogentec) zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt und Antiseren gegen das Peptid gewonnen. Das Antiserum erkennt in Western-Blot Experimenten spezifisch das Polypeptid aus Kartoffel. Zu diesem Zweck wurde Protein unter denaturierenden Bedingungen einer SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese unterworfen, auf Nitrocellulosemembranen transferiert und mittels Immundetektion nach Angaben des Herstellers nachgewiesen (ECL-System, Amersham). Mithilfe des Antiseraums wurden transgene 15 Pflanzen der ROSA-Linien charakterisiert. Die Linien -3, -9 und -40 zeigen eine unterschiedlich starke Verringerung des Proteins im Blatt, siehe Abbildung 2 . Pflanze -40 bildet keine Knollen. Pflanzen -3 und -9 zeigen eine entsprechend starke Reduktion der Dihydroorotase Proteinmenge auch in Knollen.

20

Beispiel 7

Phänotypische Analyse der transgenen Pflanzen.

25 Pflanzen der Linien ROSA, die ein Antisensekonstrukt der Dihydroorotase tragen wurden näher charakterisiert. Die Pflanzen zeigen in unterschiedlichem Maße eine Wachstumsretardierung. Die Pflanzenlinie ROSA-40 ist so stark betroffen, daß keine Knollen gebildet werden. Pflanzen dieser Linie sind im Gewächshaus nicht 30 lebensfähig und müssen in vitro erhalten werden. Es läßt sich eine Korrelation zwischen Wachstumsretardierung und Reduktion der Dihydroorotase Proteinmenge feststellen. Dieser klare Zusammenhang weist Dihydroorotase aus Kartoffel eindeutig als neues Zielprotein für herbizide Wirkstoffe aus.

35

Beispiel 8

Erzeugung von Überexpressionsvektoren in E. coli

40 Es wurden aus der ermittelten Sequenz folgende Oligonukleotidsequenzen abgeleitet und mit einer BamHI-Restriktionsschnittstelle sowie zwei überhängenden Basen versehen.

1. 5'-Primer aaggatccGCAAAATGGAGCTCTCA

45

2. 3'-Primer aaggatccTCAGAGAGGCCGGAAC

Die PCR-Reaktionsgemische enthielten 8 ng/microliter pBSSK-pyrcSt5 DNA, 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 200 µM Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KC1, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 1,5 mM MgCl₂) und 0.02 U/µl Taq Polymerase (Perkin Elmer).

5 Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

	Denaturierungstemperatur:	92°C, 1 min
	Anlagerungstemperatur:	52°C, 1 min
	Elongationstemperatur:	72°C, 2,5 min
10	Anzahl der Zyklen:	30

Die PCR-Fragmente wurden über BamHI in den Überexpressionsvektor pQE9 kloniert und zur Proteinproduktion mittels IPTG-Induktion nach Standardmethoden eingesetzt. (siehe Handbuch: The QiaExpressionist, Qiagen, Hilden).

Beispiel 9

Testsystem zur Messung der Dihydroorotase-Aktivität

- 20 Der bisher entwickelte enzymatische Nachweis zur Messung der Dihydroorotaseaktivität nach Mazus und Buchowicz, (Acta Biochimica Polonica (1968), 15(4), 317-325) beruht auf der Detektion des gebildeten Orotats in einem mit Dihydroorotatdehydrogenase gekoppelten Reaktionsansatz bei 280 nm. Dies setzt eine hohe Aktivität des Hilfsenzyms, der Dihydroorotatdehydrogenase voraus. Eine käuflich erhältliche Präparation aus *Zymobacterium oroticum* (Sigma) erwies sich als zu unrein.
- 25 30 Um eine Massentestung durchführen zu können, muß die spezifische Dihydroorotatdehydrogenase-Aktivität mindestens zehnfach höher sein, als in der käuflichen Präparation vorliegend. Eine solche Aktivität konnte erhalten werden durch Präparation einer Dihydroorotatdehydrogenase Aktivität aus *Neurospora crassa* (R.W. Miller, Methods in Enzymology LI, 1978, 63 - 69) nach Klonierung einer pflanzlichen Dihydroorotatdehydrogenase und deren Expression in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Eine weitere Verbesserung des Testsystems wurde durch Messung bei 340 nm erreicht.
- 35 40 Es wurde zunächst eine Dihydroorotatdehydrogenase aus *Arabidopsis thaliana* isoliert. (siehe Genbank Acc. Nr. X62909, Minet et al., Plant J. (1992), 2 (3), 417-422).

Es wurden aus dem Datenbankeintrag der Dihydroorotatdehydrogenase 45 Sequenz folgende Oligonukleotidsequenzen abgeleitet

1. 5'-Primer aaggatccatggccggaaggcgtg

2. 3'-Primer aaggatccttagtggtggtggtggtgtttgtggatggggc

5 Die PCR-Reaktionsgemische enthielten 10 ng Plasmid DNA einer
Arabidopsis thaliana cDNA im Vektor pFL61 (ATCC 77600), 0,5
microm der entsprechenden Oligonukleotide, 200 microm Nukleotide
(Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 1,5 mM
MgCl₂) und 0,02 U/μl Taq Polymerase (Perkin Elmer). Die Amplifika-
10 tionsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Denaturierungstemperatur: 92°C, 0,5 min
Anlagerungstemperatur: 60°C, 0,5 min
Elongationstemperatur: 72°C, 1,5 min
15 Anzahl der Zyklen: 35

Das resultierende PCR-Fragment wurde über die BamHI Schnittstellen zunächst in den Hefeexpressionsvektor pYES2 (Invitrogen) kloniert. Das erzeugte Konstrukt wurde pYES2-pyrDA_t genannt.

20

Beispiel 10

Klonierung einer pflanzlichen Dihydroorotatdehydrogenase aus Tabak

25

Weiterhin wurde das in Beispiel 9 beschriebene PCR-Fragment für ein heterologes Screening einer Tabak Phagen cDNA Bank eingesetzt. Die für die Erstellung der Tabak Phagen cDNA Bank eingesetzte cDNA wurde aus RNA von TabakzellSuspensionskulturen erhalten. Die Erstellung der cDNA Bank erfolgte nach Angaben des Herstellers (Stratagene). Es wurden 3,0 x 10⁵ Lambda Phagen der cDNA-Bibliothek aus Nicotiana tabacum auf Agarplatten mit E. coli XLI-Blue als Bakterienstamm ausplattiert.

35 Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0=87969-309-6) auf Nylonfilter (Duralon UV, Stratagene) überführt und auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungssonde diente das oben beschriebene PCR-Fragment, das mit Hilfe des Markierungs- und
40 Detektionssystems (Boehringer, Mannheim) nach Herstellerangaben DIG-markiert wurde. Die Hybridisierung der Membran erfolgte in DIG EasyHyb (Boehringer) bei 42°C für 16 Stunden. Anschließend wurden die Filter 3 x 20 Minuten in 2 x SSC, 0,1 % SDS bei 60°C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden mittels des DIG-
45 Detektionssystems von Boehringer mit CDP-Star als Substrat durch

Lumineszenz auf Hyperfilm ECL (Amersham) sichtbar gemacht und durch Standardtechniken gereinigt und vereinzelt.

Es resultierten zehn identische Klone, von denen der Klon pyrDT10
5 vollständig sequenziert wurde (SEQ-ID No. 3). Ein EcoRI Verdau
der Klones zeigt ein 1962 Basenpaar großes EcoRI-Fragment mit
einem offenen Leseraster von 458 Aminosäuren, einem Startcodon in
Position 305-307 und einem Stopcodon in Position 1679-1681. Die
abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ-ID No. 4) der Dihydroorotatde-
10 hydrogenase aus Tabak zeigt 72% Identität zur Aminosäuresequenz
aus Arabidopsis, 51% zu Ratte, 43% zu Hefe und 37% zu E. coli.
Die Identität wurde mit dem Programm BLASTP erhalten. (Altschul
et al., Nucleic Acids Res. (1997) 25, 3389-3402).

15 Es wurden aus der ermittelten Sequenz folgende Oligonukleotidse-
quenzen abgeleitet und mit einer KpnI-Restriktionsschnittstelle
sowie zwei überhängenden Basen versehen.

1. 5'-Primer ggggtaccatgagacaaagggttggatt

20

2. 3'-Primer ggggtaccttagtggtggtggtggtggtggagaggagccggcaaccca

Die PCR-Reaktionsgemische enthielten 5 ng/ μ l pBSSK-pyrDT10 DNA,
0,5 μ M der entsprechenden Oligonukleotide, 200 μ M Nukleotide
25 (Pharmacia), 50 mM KC1, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bie 25°C), 1,5 mM
MgCl₂ und 0,02 U/ μ l Taq Polymerase (Perkin Elmer). Die Amplifika-
tionsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Denaturierungstemperatur: 92°C, 1 min.
30 Anlagerungstemperatur: 52°C, 1 min.
Elongationstemperatur: 72°C, 2,5 min.
Anzahl der Zyklen: 30

Das PCR-Fragment der Tabak Dihydroorotatdehydrogenase wurde über
35 KpnI-Schnittstellen in den Hefeexpressionsvektor pYES2 (Invitro-
gen) kloniert. Dieses Konstrukt (pYES-pyrDT10) und das Ara-
bidopsis Dihydroorotatdehydrogenase-Konstrukt pYES2-pyrDAT wurden
zur Komplementation der ura1-Hefemutante eingesetzt (Minet et
al., Gene (1992), 121(2), 393-6). Erhaltene Hefeklone wurden in
40 Flüssigkultur über Nacht in Vollmedium mit 1% Galaktose angezo-
gen.

Beispiel 11

45 Enzymgewinnung pflanzlicher Dihydroorotase und Dihydroorotatde-
hydrogenase und Messung der Dihydroorotaseaktivität

Die E.coli-Expressionskulturen der Dihydroorotase und die Hefe-expressionskultur enthaltend die Dihydrorotatehydrogenase aus Tabak (oder Arabidopsis) wurden jeweils getrennt mittels Druck-aufschlußverfahren an der French Press unter Maximaldruck in einer 20 ml Druckkammer oder mit Hilfe einer Glaskugelmühle (IMA-Desintegrator) aufgeschlossen. 10 ml Puffer (0,1M KH₂PO₄; pH 7,5; 0,4M Saccharose, 0,1 mM DTT) werden pro 1 g Zellpellet verwendet. Durch Zugabe der 2,5 fachen Menge an Glasperlen (d=0,5mm) wird das Pellet in der Glaskugelmühle 20 min bei 4°C und 2500rpm aufgeschlossen. Der Aufschluß wird bei 4°C und 100.000g für 20 Minuten zentrifugiert. Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde in einem photometrischen Assay durch Messung bei 340 nm an einem Photometer (Uvikon 933, Kontron) durchgeführt. Die Wahl der Überexpressionsvektoren ermöglichte auch eine Aufreinigung der Dihydroorotase und der Dihydrorotatehydrogenase über den Histidin-Anker nach Standardmethoden in einem Schritt unter nativen Bedingungen, wenn kein DTT im Aufschlußpuffer verwendet wurde (vergl. auch Handbuch: The QiaExpressionist, Qiagen, Hilden). Die Eluate wurden durch Dialyse umgepuffert in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.1; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 10 mM Cystein; 10 µM ZnCl₂, 20 µM NAD. Je 10-100µl der umgepufferten Enzymfraktion wurden auf 700 µl mit Puffer aufgefüllt und gegen eine Referenzküvette mit 700 µl Reaktionspuffer und 100 µl eines Proteinhomogenats untransformierter E. coli Kultur gemessen. Die Reaktion wurde mit 7 mM Carbamyl-Aspartat gestartet. Es wurden gleiche Mengen Gesamtprotein für die Messungen der untransformierten bzw. transformierten E. coli Extrakte eingesetzt.

Alternativ zu pflanzlichen Dihydrorotatehydrogenase-Aktivitäten exprimiert in Hefen kann eine Dihydrorotatehydrogenase-Aktivität präpariert aus Neurospora crassa eingesetzt werden, siehe R.W. Miller, Dihydrorotatehydrogenase, (in: Methods in Enzymology 51 (1978), 63 - 69).

Alternativ kann die Dihydroorotase auch ohne Kopplung an Dihydroorotatehydrogenase in einem colorimetrischen Test geringerer Sensitivität nach Prescott und Jones (Anal. Biochem. (1969) 32, 408-419) gemessen werden. Dazu wurde die Dihydroorotaseaktivität in 50 mM Tris-HCl, 1 mM Dihydroorotate (pH 8,5) nach Inkubation bei 37°C durch Nachweis des gebildeten Carbamoylaspartats gemessen. Voraussetzung hierfür ist die in diesem Beispiel beschriebene Proteinpräparation mit hoher Proteinaktivität.

Die mit den beschriebenen Testsystemen gemessene Aktivität der Dihydroorotase aus Kartoffel kann mit bekannten Dihydroorotase Inhibitoren, wie 6-L-Thiodihydrorotat oder 2-Oxo-1,2,3,6-Tetra-

22

hydropyrimidin-4,6-Dicarboxylat (Christopherson et al., Biochemical Society Transactions 23: 888-893, 1995) reduziert werden.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen Dihydroorotase, dadurch gekennzeichnet, daß diese DNA-Sequenz die Nukleotidabfolge SEQ-ID NO:1 aufweist.
- 5 2. DNA-Sequenzen, die mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 gemäß Anspruch 1 oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, hybridisieren und für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer Dihydroorotase besitzt.
- 10 3. Protein mit Dihydroorotase-Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ-ID NO: 2 darstellt.
- 15 4. Protein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die Teilsequenz 50 - 300 aus SEQ-ID NO: 2 enthält.
- 20 5. Protein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die in SEQ-ID NO: 2 dargestellte Sequenz enthält.
- 25 6. Verwendung von DNA-Sequenzen nach Anspruch 1 oder 2 zur Einführung in pro- oder eukaryontische Zellen, wobei diese Sequenzen gegebenenfalls mit Steuerelementen, die die Transkription und Translation in den Zellen gewährleisten, verknüpft sind und zur Expression einer translatierbaren mRNA, die die Synthese einer Dihydroorotase bewirkt, führen.
- 30 7. Verwendung der DNA-Sequenzen nach Anspruch 1 und 2 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung.
- 35 8. Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 kodierend für eine Dihydroorotase und der DNA-Sequenz-SEQ ID No. 3 kodierend für eine Dihydroorotatdehydrogenase zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung.
- 40 9. Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die die Aktivität der pflanzlichen Dihydroorotase inhibieren, dadurch gekennzeichnet, daß in einem ersten Schritt unter Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 Dihydroorotase hergestellt wird und in einem zweiten Schritt die Aktivität der pflanzli-

chen Dihydroorotase in Anwesenheit einer Testsubstanz gemessen wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die
5 Messung der pflanzlichen Dihydroorotase in einem High-Throughput-Screening (HTS) ausgeführt wird.
11. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung, die die Dihydroorotase Aktivität in Pflanzen hemmen,
10 bestehend aus
 - a) der Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzengeweben, oder Pflanzenzellen, die eine zusätzliche DNA-Sequenz codierend für ein Enzym mit Dihydroorotase Aktivität enthalten und in der Lage sind eine enzymatisch aktive Dihydroorotase überzuexprimieren;
 - b) das Aufbringen einer Substanz auf transgene Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile sowie auf nicht-transformierte Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile;
 - c) das Bestimmen des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz; und
 - d) dem Vergleich des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der transgenen und der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile nach der Aufbringung der chemischen Substanz;
- 35 wobei die Unterdrückung des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit der nicht-transformierten Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile ohne jedoch das Wachstum oder die Überlebensfähigkeit der transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe oder Pflanzenteile stark zu unterdrücken, belegt, daß die Substanz aus b) herbizide Aktivität zeigt und die Enzymaktivität in Pflanzen inhibiert.
40
12. Testsystem basierend auf der Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 nach Anspruch 1 oder 2 zur Identifizierung von Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung.

13. Testsystem basierend auf der Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 zur Identifizierung von Inhibitoren der Dihydroorotase mit herbizider Wirkung.
5
14. Testsystem gemäß Anspruch 12 oder 13 zur Identifizierung von Inhibitoren pflanzlicher Dihydroorotase, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym mit einem zu untersuchenden Testsubstrat inkubiert und nach einer geeigneten Reaktionszeit die enzymatische Aktivität des Enzyms im Vergleich zur Aktivität des nicht gehemmten Enzyms ermittelt wird.
10
15. Inhibitoren pflanzlicher Dihydroorotase.
- 15 16. Inhibitoren pflanzlicher Dihydroorotase, identifiziert unter Verwendung eines Testsystems nach Anspruch 12, 13 oder 14.
17. Inhibitoren, identifiziert nach einem der Ansprüche 15 oder 16 zur Verwendung als Herbizid.
20
18. Verfahren zur Beseitigung von unerwünschtem Pflanzenwuchs, dadurch gekennzeichnet, daß die zu beseitigenden Pflanzen mit einer Verbindung behandelt werden, die spezifisch an Dihydroorotase, codiert durch eine DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2, bindet und deren Funktion inhibiert.
25

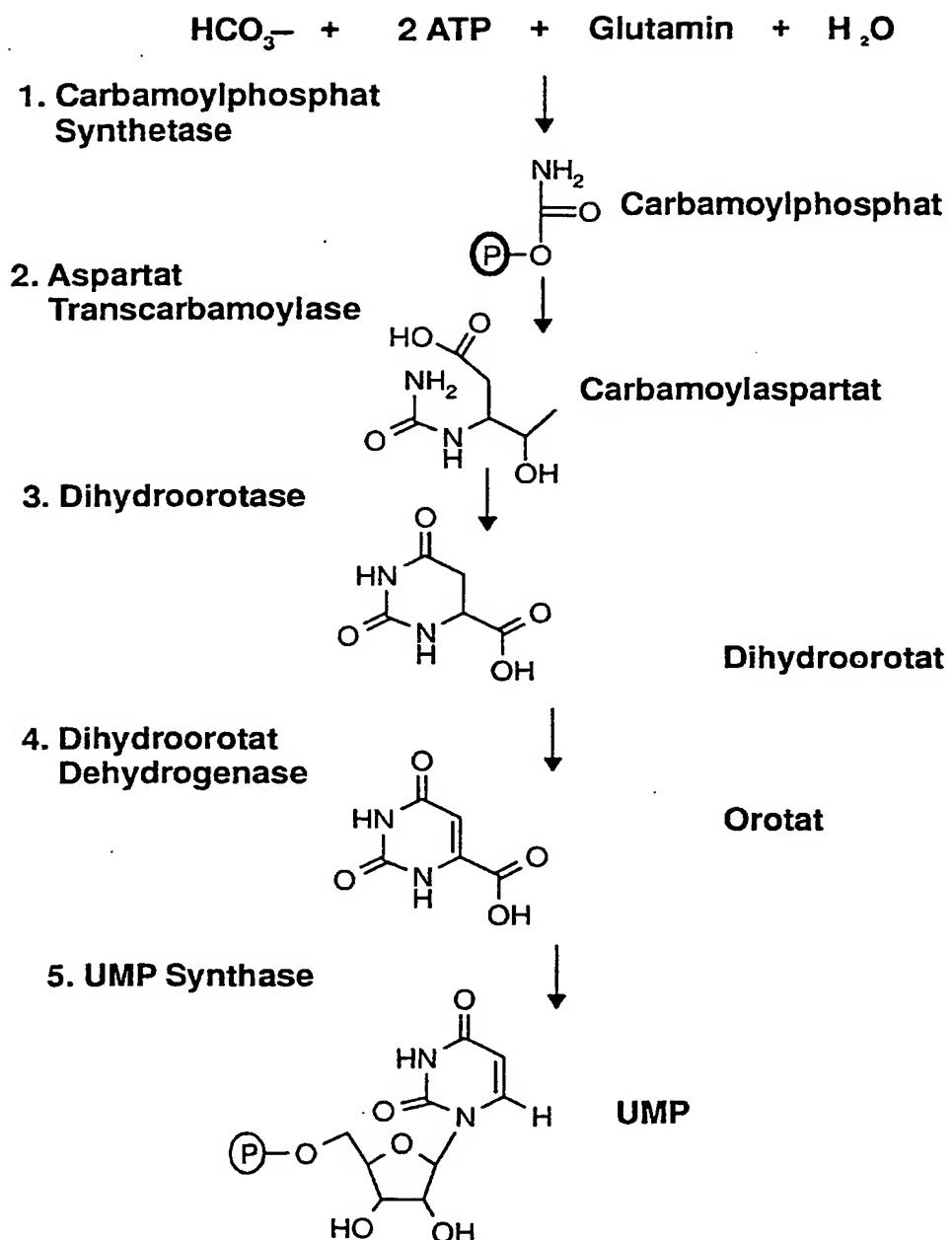
30

35

40

45

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/2

FIG.2

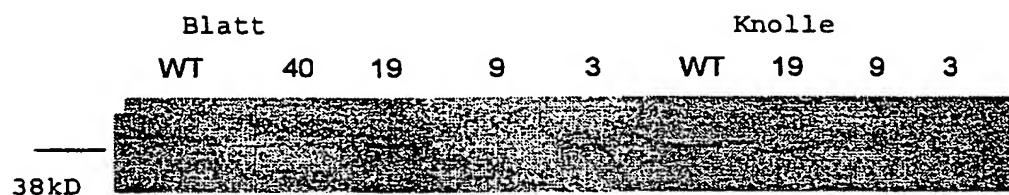
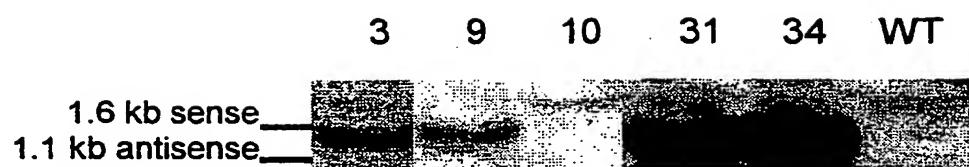


FIG.3



Ersatzblatt (Regel 26)

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Dihydroorotase aus Pflanzen

<130> O.Z. 0050/50716

<140> DE 199 42 742.9

<141> 1999-09-07

<160> 4

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1271

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (9)..(1046)

<400> 1

ttgcaaaa atg gag ctc tca atc aca caa cct gat gat ttg cat ctt cat 50
Met Glu Leu Ser Ile Thr Gln Pro Asp Asp Trp His Leu His
1 5 10

ctc cgt gat ggt gat gtt ctt aag gca gtt gtc tct cac agt gca cat 98
Leu Arg Asp Gly Asp Val Leu Lys Ala Val Val Ser His Ser Ala His
15 20 25 30

cac ttt ggg agg gca ata gtc atg cca aat ttg aag cct cct atc act 146
His Phe Gly Arg Ala Ile Val Met Pro Asn Leu Lys Pro Pro Ile Thr
35 40 45

acc act gct gct gta gca tac cgg gag gcg ata ttg aaa tct tta 194
Thr Thr Ala Ala Ala Val Ala Tyr Arg Glu Ala Ile Leu Lys Ser Leu
50 55 60

cct gtt gat agt gat ttc aac cct ctt atg aca ctt tat ttg aca gat 242
Pro Val Asp Ser Asp Phe Asn Pro Leu Met Thr Leu Tyr Leu Thr Asp
65 70 75

aca acc agt cct atg gaa atc aaa cta gca aga gag agc cag gtc gta 290
Thr Thr Ser Pro Met Glu Ile Lys Leu Ala Arg Glu Ser Gln Val Val
80 85 90

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ttt	ggg	gtg	aag	ttg	tac	cct	gct	ggt	gcc	acg	aca	aat	tct	caa	gat	338
Phe	Gly	Val	Lys	Leu	Tyr	Pro	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Asn	Ser	Gln	Asp	
95				100					105					110		
gga	gtg	act	gat	ctt	ttc	ggg	aag	tgt	tta	cca	gtt	cta	caa	gaa	atg	386
Gly	Val	Thr	Asp	Leu	Phe	Gly	Lys	Cys	Leu	Pro	Val	Leu	Gln	Glu	Met	
				115					120					125		
gtt	gag	cat	aat	atg	cct	ctg	ctg	gtt	cat	gga	gag	gtt	act	aat	cct	434
Val	Glu	His	Asn	Met	Pro	Leu	Leu	Val	His	Gly	Glu	Val	Thr	Asn	Pro	
				130					135					140		
gag	gtt	gac	atg	ttt	gat	aga	gaa	aag	gta	ttc	att	gaa	acg	gtt	cta	482
Glu	Val	Asp	Met	Phe	Asp	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Ile	Glu	Thr	Val	Leu	
				145					150					155		
aga	ccg	ttg	gtg	cag	aaa	ttt	cca	caa	ttg	aag	gtc	gtg	atg	gag	cat	530
Arg	Pro	Leu	Val	Gln	Lys	Phe	Pro	Gln	Leu	Lys	Val	Val	Met	Glu	His	
				160					165					170		
gtt	acc	acc	att	gat	gct	gtt	aag	ttt	gtt	gaa	tct	tgc	act	gaa	gga	578
Val	Thr	Thr	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	Phe	Val	Glu	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly	
				175					180					190		
ttt	gtt	gca	gca	act	gtc	acc	cca	caa	cat	ctt	gtt	ttg	aac	agg	aat	626
Phe	Val	Ala	Ala	Thr	Val	Thr	Pro	Gln	His	Leu	Val	Leu	Asn	Arg	Asn	
				195					200					205		
tct	ctc	ttc	caa	ggg	ggc	tta	caa	ccg	cat	aat	tac	tgc	ctt	cca	gtc	674
Ser	Leu	Phe	Gln	Gly	Gly	Leu	Gln	Pro	His	Asn	Tyr	Cys	Leu	Pro	Val	
				210					215					220		
ctc	aaa	aga	gag	atc	cac	agg	gag	gca	ctt	gtg	tca	gct	gta	aca	agt	722
Leu	Lys	Arg	Glu	Ile	His	Arg	Glu	Ala	Leu	Val	Ser	Ala	Val	Thr	Ser	
				225					230					235		
gga	agt	aaa	aga	ttt	ttt	ctt	ggg	act	gat	agt	gct	cct	cat	gat	aga	770
Gly	Ser	Lys	Arg	Phe	Phe	Leu	Gly	Thr	Asp	Ser	Ala	Pro	His	Asp	Arg	
				240					245					250		
cga	aga	aaa	gag	tgt	tct	tgt	gga	tgt	gct	ggt	att	tac	aat	gca	cct	818
Arg	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Cys	Gly	Cys	Ala	Gly	Ile	Tyr	Asn	Ala	Pro	
				255					260					270		
gta	gcc	ttg	tca	gta	tat	gcg	aag	gtg	ttt	gaa	aag	gaa	aat	gca	ctc	866
Val	Ala	Leu	Ser	Val	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Glu	Lys	Glu	Asn	Ala	Leu	
				275					280					285		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gac aag ctt gaa gca ttc act agc ttc aat gga cca gat ttt tat ggg 914
Asp Lys Leu Glu Ala Phe Thr Ser Phe Asn Gly Pro Asp Phe Tyr Gly
290 295 300

ctt cct agg aac aac tca aag att aag ttg agt aag acg cca tgg aag 962
Leu Pro Arg Asn Asn Ser Lys Ile Lys Leu Ser Lys Thr Pro Trp Lys
305 310 315

gta ccc gaa tcc ttt tct tat gca tca gga gat att att ccc atg ttt 1010
Val Pro Glu Ser Phe Ser Tyr Ala Ser Gly Asp Ile Ile Pro Met Phe
320 325 330

gct ggt gaa atg ctc gac tgg ttg ccg gct cct ctc tgagaatcat 1056
Ala Gly Glu Met Leu Asp Trp Leu Pro Ala Pro Leu
335 340 345

ttgtcattct tgtactgtaa tatttgatt caaccaaaga tatagactgt aggtgtatca 1116

tctttctt catgttgatt agatattatc acgatgataa tattttca gctaataaat 1176

tatggaaaca ataagcttg cacgctcacc aaagtgcctcc tgtattctga agttctaaa 1236

ttgttcgttt gattttgaag atttactgat aaaaaa 1271

<210> 2
<211> 346
<212> PRT
<213> Solanum tuberosum

<400> 2
Met Glu Leu Ser Ile Thr Gln Pro Asp Asp Trp His Leu His Leu Arg
1 5 10 15

Asp Gly Asp Val Leu Lys Ala Val Val Ser His Ser Ala His His Phe
20 25 30

Gly Arg Ala Ile Val Met Pro Asn Leu Lys Pro Pro Ile Thr Thr Thr
35 40 45

Ala Ala Ala Val Ala Tyr Arg Glu Ala Ile Leu Lys Ser Leu Pro Val
50 55 60

Asp Ser Asp Phe Asn Pro Leu Met Thr Leu Tyr Leu Thr Asp Thr Thr
65 70 75 80

Ser Pro Met Glu Ile Lys Leu Ala Arg Glu Ser Gln Val Val Phe Gly

THIS PAGE BLANK (USPTO)

85

90

95

Val Lys Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Thr Thr Asn Ser Gln Asp Gly Val
100 105 110

Thr Asp Leu Phe Gly Lys Cys Leu Pro Val Leu Gln Glu Met Val Glu
115 120 125

His Asn Met Pro Leu Leu Val His Gly Glu Val Thr Asn Pro Glu Val
130 135 140

Asp Met Phe Asp Arg Glu Lys Val Phe Ile Glu Thr Val Leu Arg Pro
145 150 155 160

Leu Val Gln Lys Phe Pro Gln Leu Lys Val Val Met Glu His Val Thr
165 170 175

Thr Ile Asp Ala Val Lys Phe Val Glu Ser Cys Thr Glu Gly Phe Val
180 185 190

Ala Ala Thr Val Thr Pro Gln His Leu Val Leu Asn Arg Asn Ser Leu
195 200 205

Phe Gln Gly Gly Leu Gln Pro His Asn Tyr Cys Leu Pro Val Leu Lys
210 215 220

Arg Glu Ile His Arg Glu Ala Leu Val Ser Ala Val Thr Ser Gly Ser
225 230 235 240

Lys Arg Phe Phe Leu Gly Thr Asp Ser Ala Pro His Asp Arg Arg Arg
245 250 255

Lys Glu Cys Ser Cys Gly Cys Ala Gly Ile Tyr Asn Ala Pro Val Ala
260 265 270

Leu Ser Val Tyr Ala Lys Val Phe Glu Lys Glu Asn Ala Leu Asp Lys
275 280 285

Leu Glu Ala Phe Thr Ser Phe Asn Gly Pro Asp Phe Tyr Gly Leu Pro
290 295 300

Arg Asn Asn Ser Lys Ile Lys Leu Ser Lys Thr Pro Trp Lys Val Pro
305 310 315 320

Glu Ser Phe Ser Tyr Ala Ser Gly Asp Ile Ile Pro Met Phe Ala Gly
325 330 335

Glu Met Leu Asp Trp Leu Pro Ala Pro Leu

THIS PAGE BLANK (USPTO)

340

345

<210> 3
<211> 1962
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> CDS
<222> (305)..(1678)

<400> 3
gaattcggca cgagcacaaa agtagaaagg gtttgctct ccccttcat ctgtgtctca 60
taactgtgct aaaacctctc ccattttccc tcaagaacaa agccacccca aaacaccacc 120
ttgtacactc ccattgtcgc ttccagtttt gtgcacccaa taaccttttc agtcatttgt 180
atcttagcat caacaacagt tgctgtctct ctttgttcg tccaatatac tgagcatttt 240
ttgagtagta atttgaaggg tttattcagt tgttaaatat ttgatttttg ttttgttaa 300
gaaa atg aga caa agg gtt gga ttt gca ttg att aga gaa agc ttg tat 349
Met Arg Gln Arg Val Gly Phe Ala Leu Ile Arg Glu Ser Leu Tyr
1 5 10 15
cgt aag cta aaa cca agc tct gtt ccc aga cat tat tgc act tct tct 397
Arg Lys Leu Lys Pro Ser Ser Val Pro Arg His Tyr Cys Thr Ser Ser
20 25 30
tca gct aat gtt cct cct att cct cca cct aag att cct cat tct tct 445
Ser Ala Asn Val Pro Pro Ile Pro Pro Lys Ile Pro His Ser Ser
35 40 45
aaa aag gga agg ttg ttt aca gga gcc act att ggt cta cta ata gct 493
Lys Lys Gly Arg Leu Phe Thr Gly Ala Thr Ile Gly Leu Leu Ile Ala
50 55 60
ggg gga gct tat gca agt acg gtt gat gag gcc acc ttc tgt ggc tgg 541
Gly Gly Ala Tyr Ala Ser Thr Val Asp Glu Ala Thr Phe Cys Gly Trp
65 70 75
cta ttc tca gca aca aaa cta gta aat ccg ttc ttt gca ttt ctg gat 589
Leu Phe Ser Ala Thr Lys Leu Val Asn Pro Phe Phe Ala Phe Leu Asp
80 85 90 95
cca gag gtt gct cac aaa ctg gcg gtc tct gct gca gcc cga gga tgg 637

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Pro Glu Val Ala His Lys Leu Ala Val Ser Ala Ala Ala Arg Gly Trp
 100 105 110

gtt cca agg gag aag agg cca gat cct cct ata ttg ggc ctt gat gtg 685
 Val Pro Arg Glu Lys Arg Pro Asp Pro Ile Leu Gly Leu Asp Val
 115 120 125

tgg gga aga agg ttc tca aat cct gtt ggt ctt gct gct ggt ttt gac 733
 Trp Gly Arg Arg Phe Ser Asn Pro Val Gly Leu Ala Ala Gly Phe Asp
 130 135 140

aag aat gct gag gct gtt gaa gga ttg ctt gga tta ggt ttt ggc ttt 781
 Lys Asn Ala Glu Ala Val Glu Gly Leu Leu Gly Leu Gly Phe Gly Phe
 145 150 155

gtt gag gtt ggc tca gta act ccc att cca cag gaa ggc aac cca aaa 829
 Val Glu Val Gly Ser Val Thr Pro Ile Pro Gln Glu Gly Asn Pro Lys
 160 165 170 175

cca cgt ata ttt agg ttg cca aat gaa ggt gct ata ata aat agg tgt 877
 Pro Arg Ile Phe Arg Leu Pro Asn Glu Gly Ala Ile Ile Asn Arg Cys
 180 185 190

ggc ttc aat agt gaa gga atc gtt gtg gtt gcc aaa cga ttg ggt gct 925
 Gly Phe Asn Ser Glu Gly Ile Val Val Val Ala Lys Arg Leu Gly Ala
 195 200 205

cag cat ggt aag aga aag ttg gaa aca tct agt act tca tct cca gct 973
 Gln His Gly Lys Arg Lys Leu Glu Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro Ala
 210 215 220

gga gat gaa gtc aag cat gga ggg aaa gct ggt cct ggt att ctt ggt 1021
 Gly Asp Glu Val Lys His Gly Gly Lys Ala Gly Pro Gly Ile Leu Gly
 225 230 235

gtt aac ctt gga aag aat aaa aca agt gaa gac gct gca gca gat tat 1069
 Val Asn Leu Gly Lys Asn Lys Thr Ser Glu Asp Ala Ala Ala Asp Tyr
 240 245 250 255

gtg caa gga gtc cat aca tta tct cag tat gct gac tac ttg gta att 1117
 Val Gln Gly Val His Thr Leu Ser Gln Tyr Ala Asp Tyr Leu Val Ile
 260 265 270

aat atc tca tcc cca aat act cca gga cta cgc cag ctt cag gga aga 1165
 Asn Ile Ser Ser Pro Asn Thr Pro Gly Leu Arg Gln Leu Gln Gly Arg
 275 280 285

aag cag ttg aag gat ctt gtg aag aag gtt caa gca gct cgt gat gaa 1213

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Lys Gln Leu Lys Asp Leu Val Lys Lys Val .Gln Ala Ala Arg Asp Glu			
290	295	300	
atg cag tgg ggt gag gaa gga cct ccg cct tta ctt gtg aaa att gct 1261			
Met Gln Trp Gly Glu Gly Pro Pro Pro Leu Leu Val Lys Ile Ala			
305	310	315	
cca gat ttg tct aaa caa gat ctt gaa gat att gca gtg gtg gct gtt 1309			
Pro Asp Leu Ser Lys Gln Asp Leu Glu Asp Ile Ala Val Val Ala Val			
320	325	330	335
gct ctt cgt gtg gat gga ctg att ata tca aat act act gtc caa aga 1357			
Ala Leu Arg Val Asp Gly Leu Ile Ile Ser Asn Thr Thr Val Gln Arg			
340	345	350	
cca gat tcc ata agt caa aac cct gtg gct caa gag gct ggt ggc ttg 1405			
Pro Asp Ser Ile Ser Gln Asn Pro Val Ala Gln Glu Ala Gly Gly Leu			
355	360	365	
agt ggg aag cca ctc ttt gac atg tca aca aat ata ctg aag gag atg 1453			
Ser Gly Lys Pro Leu Phe Asp Met Ser Thr Asn Ile Leu Lys Glu Met			
370	375	380	
tac gtt ctg act aag gga agg att cct ctg att ggc act ggg ggt att 1501			
Tyr Val Leu Thr Lys Gly Arg Ile Pro Leu Ile Gly Thr Gly Gly Ile			
385	390	395	
agc agt ggc gag gat gct tac aag aaa att cga gct ggt gcc act ctt 1549			
Ser Ser Gly Glu Asp Ala Tyr Lys Ile Arg Ala Gly Ala Thr Leu			
400	405	410	415
gtt cag ctt tat aca gca ttt gca tat gga ggc cct gca ctt atc ccc 1597			
Val Gln Leu Tyr Thr Ala Phe Ala Tyr Gly Gly Pro Ala Leu Ile Pro			
420	425	430	
gat ata aag gat gaa ctt gct cgt tgc tta gaa aag gat ggt tat aag 1645			
Asp Ile Lys Asp Glu Leu Ala Arg Cys Leu Glu Lys Asp Gly Tyr Lys			
435	440	445	
tca atc agt gag gct gtt gga gca gac tgc aga tagtagtagt tgatatacta 1698			
Ser Ile Ser Glu Ala Val Gly Ala Asp Cys Arg			
450	455		
aaccagtctt ttgagtttga gggcagagc acattttgc cacttataat aaatgatata 1758			
tttatggttt cctcccatgt ggcgtcatat catttgcttc gtaatttgtg atgtctcccc 1818			
aaattttagc tgtttaggga ttactcgtagg caggtgaccc gtatTTTGA aatgtaatat 1878			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

aggaacgaaa ctttgtatgt ttggttgagt ttttcttga tatggaattt aatccacaca 1938

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaga attc 1962

<210> 4
<211> 458
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

<400> 4
Met Arg Gln Arg Val Gly Phe Ala Leu Ile Arg Glu Ser Leu Tyr Arg
1 5 10 15

Lys Leu Lys Pro Ser Ser Val Pro Arg His Tyr Cys Thr Ser Ser Ser
20 25 30

Ala Asn Val Pro Pro Ile Pro Pro Pro Lys Ile Pro His Ser Ser Lys
35 40 45

Lys Gly Arg Leu Phe Thr Gly Ala Thr Ile Gly Leu Leu Ile Ala Gly
50 55 60

Gly Ala Tyr Ala Ser Thr Val Asp Glu Ala Thr Phe Cys Gly Trp Leu
65 70 75 80

Phe Ser Ala Thr Lys Leu Val Asn Pro Phe Phe Ala Phe Leu Asp Pro
85 90 95

Glu Val Ala His Lys Leu Ala Val Ser Ala Ala Ala Arg Gly Trp Val
100 105 110

Pro Arg Glu Lys Arg Pro Asp Pro Pro Ile Leu Gly Leu Asp Val Trp
115 120 125

Gly Arg Arg Phe Ser Asn Pro Val Gly Leu Ala Ala Gly Phe Asp Lys
130 135 140

Asn Ala Glu Ala Val Glu Gly Leu Leu Gly Leu Gly Phe Gly Phe Val
145 150 155 160

Glu Val Gly Ser Val Thr Pro Ile Pro Gln Glu Gly Asn Pro Lys Pro
165 170 175

Arg Ile Phe Arg Leu Pro Asn Glu Gly Ala Ile Ile Asn Arg Cys Gly
180 185 190

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Phe Asn Ser Glu Gly Ile Val Val Val Ala Lys Arg Leu Gly Gln
195 200 205

His Gly Lys Arg Lys Leu Glu Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro Ala Gly
210 215 220

Asp Glu Val Lys His Gly Gly Lys Ala Gly Pro Gly Ile Leu Gly Val
225 230 235 240

Asn Leu Gly Lys Asn Lys Thr Ser Glu Asp Ala Ala Ala Asp Tyr Val
245 250 255

Gln Gly Val His Thr Leu Ser Gln Tyr Ala Asp Tyr Leu Val Ile Asn
260 265 270

Ile Ser Ser Pro Asn Thr Pro Gly Leu Arg Gln Leu Gln Gly Arg Lys
275 280 285

Gln Leu Lys Asp Leu Val Lys Lys Val Gln Ala Ala Arg Asp Glu Met
290 295 300

Gln Trp Gly Glu Glu Gly Pro Pro Pro Leu Leu Val Lys Ile Ala Pro
305 310 315 320

Asp Leu Ser Lys Gln Asp Leu Glu Asp Ile Ala Val Val Ala Val Ala
325 330 335

Leu Arg Val Asp Gly Leu Ile Ile Ser Asn Thr Thr Val Gln Arg Pro
340 345 350

Asp Ser Ile Ser Gln Asn Pro Val Ala Gln Glu Ala Gly Gly Leu Ser
355 360 365

Gly Lys Pro Leu Phe Asp Met Ser Thr Asn Ile Leu Lys Glu Met Tyr
370 375 380

Val Leu Thr Lys Gly Arg Ile Pro Leu Ile Gly Thr Gly Gly Ile Ser
385 390 395 400

Ser Gly Glu Asp Ala Tyr Lys Ile Arg Ala Gly Ala Thr Leu Val
405 410 415

Gln Leu Tyr Thr Ala Phe Ala Tyr Gly Gly Pro Ala Leu Ile Pro Asp
420 425 430

Ile Lys Asp Glu Leu Ala Arg Cys Leu Glu Lys Asp Gly Tyr Lys Ser
435 440 445

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ile Ser Glu Ala Val Gly  Asp Cys Arg
450 455

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENGESETZT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. März 2001 (15.03.2001)

PCT

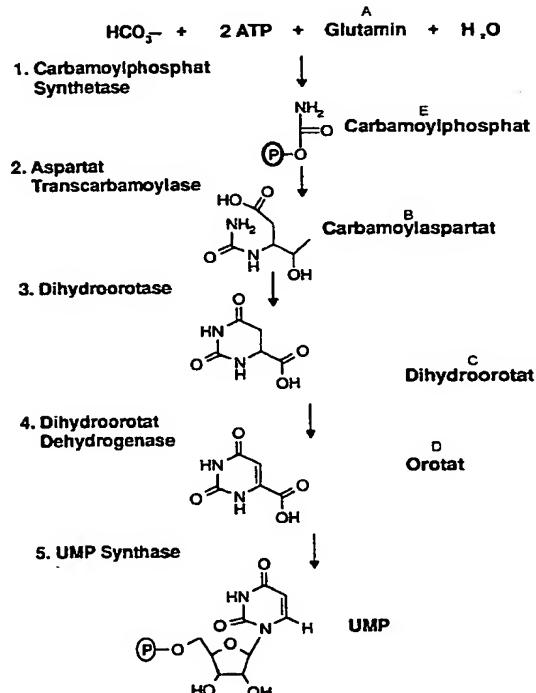
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/18190 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/29, 15/82, 9/86, A01H 5/00, C12N 15/11, C12Q 1/34, 1/68, C07K 16/16
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08581
- (72) Erfinder; und
- (22) Internationales Anmeldedatum: 2. September 2000 (02.09.2000)
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EHRHARDT, Thomas [DE/DE]; Maulbronner Hof 49, 67346 Speyer (DE). LER-CHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE). STITT NIGEL, Marc [GB/DE]; Brückenstrasse 16, 68535 Edingen-Neckarhausen (DE). ZRENNER, Rita [DE/DE]; Im Steg 36, 68526 Ladenburg (DE). SCHROEDER, Michael [DE/DE]; Talstrasse 23, 68259 Mannheim (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 42 742.9 7. September 1999 (07.09.1999) DE
- (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DIHYDROOROTASE EXTRACTED FROM PLANTS

(54) Bezeichnung: DIHYDROOROTASE AUS PFLANZEN



(57) Abstract: The invention relates to a DNA which codes for a polypeptide having dihydroorotase (EC 3.5.2.3) activity. The invention also relates to the use of these nucleic acids for producing a test system.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine DNA codierend für ein Polypeptid mit Dihydroorotase (EC 3.5.2.3) Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Nukleinsäure zur Herstellung eines Testsystems.

WO 01/18190 A3

- A...GLUTAMINE
- 1...CARBAMOYL PHOSPHATE SYNTHETASE
- 2...ASPARATE TRANSCARBAMOYLASE
- B...CARBAMOYL ASPARATE
- C...DIHYDROOROTATE
- 4...DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE
- D...OROTATE
- E...CARBA MOYL PHOSPHATE



(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 11. Oktober 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern.	Appl. No.
PCT	00/08581

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC 7 C12N15/29 C12N15/82 C12N9/86 A01H5/00 C12N15/11 C12Q1/34 C12Q1/68 C07K16/16				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)				
IPC 7 C12N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, STRAND				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL SEQUENCE DATABASE 'Online! 27 May 1997 (1997-05-27) ZHOU, L., ET AL. : "characterization of the Arabidopsis thaliana cDNA encoding Dihydroorotate (accession n. AF000146) (PGR97-115)" XP002165268 accession no. AF000146 --- DATABASE EMBL SEQUENCE DATABASE 'Online! 28 July 1999 (1999-07-28) ALCALA, J., ET AL. : "generation of ESTs from tomato callus tissue" XP002165269 accession no. AI895210 --- -/--			2
X				2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed				
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family				
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report		
12 April 2001		04/05/2001		
Name and mailing address of the ISA		Authorized officer		
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Holtorf, S		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat[redacted] Application No
PCT/EP 00/08581

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHRISTOPHERSON R I ET AL: "Inhibitors of dihydro-orotase, amidophosphoribosyltransferase and IMP cyclohydrolase as potential drugs." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 23, no. 4, 1995, pages 888-893, XP000997720 655th Meeting of the Biochemical Society; Manchester, England, UK; July 18-21, 1995 ISSN: 0300-5127 cited in the application see abstract page 890 ---	15,17
X	CHRISTOPHERSON R I ET AL: "MERCAPTAN AND DICARBOXYLATE INHIBITORS OF HAMSTER DIHYDROOROTASE" BIOCHEMISTRY, vol. 28, no. 2, 1989, pages 463-470, XP002165266 ISSN: 0006-2960 the whole document ---	15,17
A	MINET, M., ET AL. : "complementation of Saccharomyces cerevisiae auxotrophic mutants by Arabidopsis thaliana cDNAs" PLANT JOURNAL, vol. 2, 1992, pages 417-422, XP002165267 cited in the application the whole document ---	
E	WO 01 14569 A (GEIGENBERGER PETER LUDWIG ; SCHROEDER MICHAEL (DE); BASF AG (DE); E) 1 March 2001 (2001-03-01) the whole document -----	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal ref.	Application No.
PCT/	00/08581

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0114569	A 01-03-2001	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Kennzeichen
PCT/ 00/08581

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/29 C12N15/82 C12N9/86 A01H5/00 C12N15/11 C12Q1/34 C12Q1/68 C07K16/16					
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK					
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiert Mindestprüfstoß (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N					
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoß gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen					
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, STRAND					
C. ALS WESENTLICH ANGESEHEN UNTERLAGEN					
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile				Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL SEQUENCE DATABASE 'Online! 27. Mai 1997 (1997-05-27) ZHOU, L., ET AL. : "characterization of the Arabidopsis thaliana cDNA encoding Dihydroorotate (accession n. AF000146) (PGR97-115)" XP002165268 accession no. AF000146 --- DATABASE EMBL SEQUENCE DATABASE 'Online! 28. Juli 1999 (1999-07-28) ALCALA, J., ET AL. : "generation of ESTs from tomato callus tissue" XP002165269 accession no. AI895210 --- -/-/				2
X					2
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie			
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist					
T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist					
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts			
12. April 2001		04/05/2001			
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Holtorf, S			

INTERNATIONALER FORSCHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen
PCT/00/08581

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHRISTOPHERSON R I ET AL: "Inhibitors of dihydro-orotase, amidophosphoribosyltransferase and IMP cyclohydrolase as potential drugs." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, Bd. 23, Nr. 4, 1995, Seiten 888-893, XP000997720 655th Meeting of the Biochemical Society; Manchester, England, UK; July 18-21, 1995 ISSN: 0300-5127 in der Anmeldung erwähnt see abstract Seite 890 ---	15,17
X	CHRISTOPHERSON R I ET AL: "MERCAPTAN AND DICARBOXYLATE INHIBITORS OF HAMSTER DIHYDROOROTASE" BIOCHEMISTRY, Bd. 28, Nr. 2, 1989, Seiten 463-470, XP002165266 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument	15,17
A	MINET, M., ET AL. : "complementation of Saccharomyces cerevisiae auxotrophic mutants by Arabidopsis thaliana cDNAs" PLANT JOURNAL, Bd. 2, 1992, Seiten 417-422, XP002165267 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	
E	WO 01 14569 A (GEIGENBERGER PETER LUDWIG ; SCHROEDER MICHAEL (DE); BASF AG (DE); E) 1. März 2001 (2001-03-01) das ganze Dokument -----	1-6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur gleichen Patentfamilie gehören

Internat.	Patentzeichen
PCT	00/08581

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0114569 A	01-03-2001	KEINE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)